

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AD

(11)Publication number : 04-234326
(43)Date of publication of application : 24.08.1992

(51)Int.CI.

A61K 37/04
C07K 3/22
C07K 15/06

(21)Application number : 02-417378

(71)Applicant : GREEN CROSS CORP:THE

(22)Date of filing : 27.12.1990

(72)Inventor : MATSUOKA YASUSHI
HASE SHINICHIRO
TAKECHI KAZUO
TOMIOKA SHINJI
YOKOYAMA KAZUMASA

(54) ALBUMIN PREPARATION AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain serum albumin preparation having extremely reduced albumin aggregate content and contaminant protein content and production thereof.

CONSTITUTION: A process wherein an aqueous solution containing albumin is treated with an anion exchanger and a cation exchanger to remove contaminant protein and the aqueous solution containing albumin thus purified is heat- treated. The prepared albumin preparation is a preparation substantially containing neither albumin aggregate nor transferin and having high safety.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

特開平4-234326

(43)公開日 平成4年(1992)8月24日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
A 61 K 37/04	A B Z	8317-4C		
C 07 K 3/22		7731-4H		
15/06		7731-4H		

審査請求 未請求 請求項の数3(全6頁)

(21)出願番号	特願平2-417378	(71)出願人	000137764 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号
(22)出願日	平成2年(1990)12月27日	(72)発明者	松岡 靖史 枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ十字中央研究所内
		(72)発明者	長谷 紳一郎 枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ十字中央研究所内
		(72)発明者	武智 和男 枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ十字中央研究所内
		(74)代理人	弁理士 廣瀬 孝美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルブミン製剤及びその製法

(57)【要約】

【目的】 アルブミン凝集体含量及び夾雜蛋白質含量を著しく低減させた血清アルブミン製剤及びその製法を提供する。

【構成】 アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理及び陽イオン交換体処理することにより夾雜タンパク質を除去し、かくして精製されたアルブミン含有水溶液を加熱処理する工程からなる。得られたアルブミン製剤は、アルブミン凝集体及びトランスフェリンを実質的に含まず、安全性の高い製剤である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血清アルブミン製剤であって、アルブミン凝集体を実質的に含まないことを特徴とするアルブミン製剤。

【請求項2】 血清アルブミン製剤であって、トランスフェリンを実質的に含まないことを特徴とするアルブミン製剤。

【請求項3】 血清アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理することを特徴とするアルブミン製剤の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アルブミン製剤及びその製法に関する。より詳細には、アルブミン凝集体含量及び夾雑蛋白質含量が低減された血清アルブミン製剤及びその製法に関する。

【0002】

【従来の技術】 血清アルブミンは血漿中に最も多く含まれている蛋白質で、血液中で浸透圧の維持、栄養物質や代謝物質と結合してその運搬などの機能を果たしている。上記血清アルブミンを含有する製剤は、アルブミンの喪失及びアルブミン合成低下による低アルブミン血症、出血性ショックなどの治療に用いられている。アルブミン製剤は、そこに混入してくる懸念のあるウイルスを不活化するために、通常、アルブミン含有水溶液の状態での加熱処理が汎用されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 このような方法により製造される市販のアルブミン製剤をゲル通過分析法で分析すると、該製剤中にはアルブミンの凝集体が存在することが知られている。この凝集体（通常、ポリマーと称されるので、以下、ポリマーという）は上記の加熱処理前には殆ど存在しないことから、加熱処理により熱に不安定な夾雫蛋白質の作用でアルブミンが凝集化したものと考えられる。市販のアルブミン製剤は安全に広く使用されていることから、このポリマーが特に人体に害を及ぼすとは考えられていないが、加熱変性物であることより、製剤中にできるだけ含有しないことが好ましい。

【0004】 また、アルブミン中にはトランスフェリンなどのようにアルブミンと物理化学的性質の比較的よく似た夾雫蛋白質が含まれており、分画法等の慣用の手段では効率的に分離することが困難であり、アルブミン製剤中に夾雫蛋白質が残存するという問題がある。本発明は上記の課題を解決すべく創案されたもので、本発明はポリマー含量及び夾雫蛋白質含量の少ないアルブミン製剤及びその製法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、本発明者らが上記の課題を解決すべく種々検討を重ねた結果、アルブミンを高度に精製することにより、トランスフェリン等

の夾雫蛋白質含量を激減させ得ると共に加熱処理してもポリマーが検出されないことを見出して完成したものである。即ち、本発明のアルブミン製剤は、ポリマーを実質的に含まない製剤、及びトランスフェリンを実質的に含まない製剤である。

【0006】 また、本発明のアルブミン製剤の製法は、血清アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理することを特徴とするものである。なお、上記の製法中、アルブミン含有水溶液の処理に用いられる陰イオン交換体及び陽イオン交換体としては、それぞれ強陰イオン交換体及び強陽イオン交換体が好ましい。

【0007】 本発明にかかる製剤の主成分であり又本発明にかかる製法の出発原料であるアルブミンの由来には特に制限がなく、具体的には哺乳動物、例えば、ヒト、ウシ、ウサギ等に由来するものが挙げられ、特にヒト由来のものが使用される。アルブミンを調製するための出発原料としては、例えば、コーン氏の冷アルコール分画によって得られた第V画分等が例示される。

【0008】 本発明のアルブミン製剤は、上記の血清アルブミンを適当な精製水に溶解したアルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理することにより得られる。上記の工程において、アルブミン含有水溶液中のアルブミン含量としては、通常、0.1～30% (W/V、特に明示のない限り以下同様) 程度、好ましくは約1～10%に調整される。

【0009】 本発明においては、まず、アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理に付して精製する。この陰イオン交換体処理により、ハブトグロビン、 α_1 -酸性糖蛋白質などのアルブミンより等電点の低い夾雫蛋白質が除去され精製される。使用される陰イオン交換体としては陰イオン交換基（例えば、ジエチルアミノエチル基、第四級アンモニウム基等）を有する不溶性担体であればいずれも使用することができ、より具体的には、この分野で慣用の陰イオン交換体、例えば、DEAE-セファロース、Q-セファロース（商品名、ファルマシア社製）、DEAE-トヨバール、QAE-トヨバール（商品名、いずれも東ソー社製）、A200セルロファイン（商品名、生化学工業社製）、陰イオン交換樹脂等が例示され、夾雫蛋白質除去効率の点からしてQ-セファロース、QAE-トヨバール等の強陰イオン交換体を用いるのが好ましい。

【0010】 上記の陰イオン交換体を用いる処理は、アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体と接触させることにより行われ、陰イオン交換体の使用量はアルブミン含有水溶液中の夾雫蛋白質含量、陰イオン交換体の交換能等により適宜調整されるが、アルブミン1g当たり、陰イオン交換体0.1～5ml、通常3ml程度使用される。本方法はカラム法、バッテ法のいずれの方法にて行っても

よいが、夾雜蛋白質の除去効率の面からカラム法にて行うのが好ましい。

【0011】カラム法にて行う場合、前記のアルブミン含有水溶液をpH3~6程度、好ましくはpH4.5~5.5、塩濃度としては0.001~0.2Mの塩化ナトリウム程度、好ましくは0.001~0.05Mに調整し、緩衝液

【例えば、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.1)】で平衡化した陰イオン交換体カラムを通過させ、次いで同緩衝液で展開して非吸着分を回収することにより行われる。上記の操作はアルブミンの変性を抑制するため、低温(通常、10℃以下)にて行うのが好ましい。また、バッテ法にて行う場合、上記条件に調整したアルブミン含有水溶液に、陰イオン交換体を添加して接触させ、10℃以下にて、30分~2時間程度混和した後、遠心分離等の手段により陰イオン交換体と分離し、上清を回収することにより行われる。

【0012】上記の陰イオン交換体処理により精製されたアルブミン含有水溶液は、必要に応じて、pH調整、濃度調整等がされた後、陽イオン交換体処理に付してさらに精製する。この陽イオン交換体処理により、アルブミンなどよりも高pHに等電点のあるトランスフェリンなどの夾雜蛋白質が除去されて精製される。使用される陽イオン交換体としては陽イオン交換基(例えば、スルホ基、カルボキシ基等)を有する不溶性担体であればいずれも使用することができ、より具体的には、この分野で慣用の陽イオン交換体、例えば、SP-セファデックス(商品名、ファルマシア社製)、SP-トヨバル、TSKgel SP-5PW(商品名、いずれも東ソー社製)、陽イオン交換樹脂等が例示され、夾雜蛋白質除去効率の点からしてSP-セファデックス、SP-トヨバル等の強陽イオン交換体を用いるのが好ましい。

【0013】上記の陽イオン交換体を用いる処理は、前記陰イオン交換体処理により精製されたアルブミン含有水溶液を陽イオン交換体と接触させることにより行われる。陽イオン交換体の使用量はアルブミン含有水溶液中の夾雜蛋白質含量、陽イオン交換体の交換能等により適宜調整されるが、アルブミン1g当たり、陽イオン交換体0.1~5ml、通常2ml程度使用される。本方法はカラム法、バッテ法のいずれの方法にて行ってもよいが、夾雜蛋白質の除去効率の面からカラム法にて行うのが好ましい。

【0014】カラム法にて行う場合、前記のアルブミン含有水溶液をpH4~8程度、好ましくはpH4.5~6.5、より好ましくはpH5.5~6.0、塩濃度としては0.001~0.2Mの塩化ナトリウム程度、好ましくは0.001~0.05Mに調整し、緩衝液【例えば、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.5)】で平衡化した陽イオン交換体カラムを通過させ、次いで同緩衝液で展開して非吸着分を回収することにより行われる。上記の操作はアルブミンの変性を抑制するため、低温(通常、10℃以

下)にて行うのが好ましい。また、バッテ法にて行う場合、上記条件に調整したアルブミン含有水溶液に、陽イオン交換体を添加して接触させ、10℃以下にて、30分~2時間程度混和した後、遠心分離等の手段により陽イオン交換体と分離し、上清を回収することにより行われる。

【0015】かかる陰イオン交換体処理及び陽イオン交換体処理により精製されたアルブミン含有水溶液は夾雜タンパク質含量が著しく低く、トランスフェリン、ハブトグロビン及び α_1 -酸性糖蛋白質含量は検出限界以下であり、実質的にこれらの夾雜蛋白質を含まないものである。

【0016】上記の陰イオン交換体処理及び陽イオン交換体処理により夾雜蛋白質含量が低減されたアルブミン含有水溶液は適当な濃度に調整し、例えば、バイアルに充填するなど所望の製剤形態に製剤化された後、加熱処理されて本発明のアルブミン製剤が得られる。上記の加熱処理はアルブミン製剤中に混入するおそれのあるウイルスを不活化するもので、アルブミン濃度5~30%程度、通常5又は20~25%程度に調整した水溶液として行われ、加熱温度としては、夾雜ウイルスを不活化するに十分な温度及び時間行えばよく、例えば、50~70℃、好ましくは約60℃で、5~20時間、好ましくは約10時間行われる。なお、上記の加熱処理に際しては、必要に応じてアルブミンの安定化剤、例えばN-アセチルトリプトファンナトリウム、カプリル酸ナトリウム等を単独で又は混合して添加してもよい。これらアルブミンの安定化剤は、製剤中に含有されるアルブミン1g当たり20~60mg、好ましくは40mg程度使用される。

【0017】かくして得られたアルブミン製剤は、ポリマーが実質的に含まれておらず(例えば、ゲル濾過分析法により測定した場合、アルブミンに対するポリマー含量が0.63重量%未満)、またトランスフェリンも実質的に含まれていない(例えば、一元免疫拡散法により測定した場合、アルブミンに対するトランスフェリン含量が0.008重量%未満)。なお、本発明のアルブミン製剤は、従来のアルブミン製剤と同様な用量、用法にて使用される。

【0018】

【発明の効果】本発明のアルブミン製剤は、加熱処理によりウイルスが不活化されていると共にポリマー含量及びトランスフェリン等の夾雜蛋白質含量が極めて少なく、安全性、安定性等に優れた製剤である。また、本発明のアルブミン製剤の製法は、陰イオン交換体及び陽イオン交換体による処理により、さまざまな等電点を持つ夾雜蛋白質が除去されたアルブミン含有水溶液を加熱処理するもので、夾雜蛋白質に起因するポリマー化を抑制することができ、ポリマー含量及び夾雜蛋白質含量が少なく且つ混入が危惧されるウイルスが不活化されたアル

ブミン製剤が得られる。

【0019】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するため、実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例によってなんら限定されるものではない。

【0020】実施例1

(a) アルブミン含有水溶液の調製

コーン氏の冷アルコール分画によって得られた第V画分ペースト(500g)を冷無菌蒸留水2.0リットルに溶解し、酢酸を用いてpHを4.6に調整した後、約1時間攪拌した。次いで、約-2°Cにて濾過(フィルター: 0.45μm)し、さらに冷無菌蒸留水2.0リットルを加え、1N水酸化ナトリウムでpH5.1に調整し、アルブミン含有水溶液を得た。

【0021】(b) 陰イオン交換体処理

QAE-トヨバル(580ml)をカラム(直径5cm×長さ18cm)に充填し、0.5M塩化ナトリウムで十分に洗浄した後、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.1)で平衡化し、陰イオン交換体カラムを調製した。このカラムに上記(a)のアルブミン含有水溶液を通し、さらに冷0.02M酢酸ナトリウム(pH5.1、2リットル)で洗浄した。通過液と洗浄液とを合わせ、0.8M炭酸水素ナトリウムにてpHを5.5に調整した。

【0022】(c) 陽イオン交換体処理

SP-トヨバル(400ml)をカラムに充填し、0.5M塩化ナトリウムで十分に洗浄した後、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.5)で平衡化し、陽イオン交換体カラムを調製した。このカラムに上記(b)で得られたアルブミン含有水溶液を通し、さらに0.02M酢酸ナトリウム(pH5.5、1.2リットル)で洗浄した。通過液と洗浄液とを合わせた後、ペリコンにて透析・濃縮し、 $A_{280} = 1.49$ (アルブミン濃度: 28%)となるように調製した。

【0023】(d) 加熱処理

上記(c)で得られたアルブミン含有水溶液に、該水溶液10ml当り1.2mlの安定化剤溶液(100ml中、N-アセチルトリプトファン5.55g及びカプリル酸ナトリウム3.89g含有)を添加し、1N水酸化ナトリウムにてpHを6.85に調整した後、除菌濾過した。次いで、アルブミン濃度が25%となるように調整した後、所定量をバイアルに分注し、60°Cにて10時間加熱処理してアルブミン製剤(以下、本発明製剤という)を得た。また、比較例として、SP-トヨバルカラム処理工程を除外した以外は上記製法と実質的に同様にしてアルブミン製剤(以下、比較製剤という)を調製した。

【0024】(i) アルブミン製剤中のポリマー含量の測定

得られた本発明製剤及び比較製剤中のポリマー含量をゲル濾過分析法により測定した。なお、ゲル濾過分析は下

記の条件にて行った。

(a) サンプル: 本発明製剤及び比較製剤を、下記の緩衝液で50倍に希釈し、濾過(フィルター: 0.45μm)した溶液を20μl注入した。

(b) カラム: TSKgel G3000SW(東ソー社製)を充填したカラム(直径7.8mm×長さ30cm)を使用した。

(c) 緩衝液: 0.1M KH₂PO₄ / 0.3M NaCl(pH6.9)

(d) 流速: 1ml/分

(e) 検出波長: $\lambda = 280\text{nm}$

(f) 装置: ウォーターズHPLCシステム

【0025】測定結果を図1(本発明製剤)及び図2(比較製剤)に示す。図2から明らかのように、比較製剤においては、明確にポリマーのピークが検出され、アルブミンに対するポリマー含量は2.6重量%であった。一方、図1に示されるように、本発明製剤においては、ポリマーのピークは検出されず、ポリマーは実質的に含まれていないことが判明した。なお、図1において、アルブミン二量体のアルブミンに対する含量は0.63重量%であり、本ゲル濾過分析法ではこの量の不純物を検出できることが示された。従って、本発明製剤においてはポリマーのピークが検出されないことから、本発明製剤中のポリマー含量はアルブミンに対して0.63重量%未満であることが明らかになった。

【0026】(ii) アルブミン製剤中の夾雜蛋白質の測定
本発明製剤及び比較製剤中の α_1 -酸性糖蛋白質(α_1 -AG)、ハプトグロビン(Hp)及びトランスフェリン(Tf)含量の測定を行った。その結果を表1に示す。

なお、夾雜蛋白質の測定は、一元免疫拡散法(Mancini法: Mancini G.ら, Immunochemistry, 第2巻、第3号、第235-254頁、1965年)により行った。この際、用いた抗 α_1 -酸性糖蛋白質血清、抗ハプトグロビン血清及び抗トランスフェリン血清は、ウサギを免疫動物として常法により調製したものである。これらの抗血清より作製した一元免疫拡散用ゲルを用い、それぞれに対応する夾雜蛋白質に対する沈降輪面積の標準曲線を図3~図5に示す。図3~図5から明らかのように、 α_1 -AGの検出限界は4mg/dlであり、Hpの検出限界は6.5mg/dlであり、Tfの検出限界は2mg/dlである。下記表1に示されるように、本発明のアルブミン製剤は α_1 -AG、Hp及びTfがいずれも検出限界以下であり、夾雜蛋白質含量は極めて少なく、実質的に含まれていないことが判明した。なお、上記のようにTfの検出限界は2mg/dlであり、また本発明製剤のアルブミン含量は25%であることから、本発明製剤中のTf含量はアルブミンに対して0.008重量%未満であることが明らかになった。

【0027】

【表1】

	夾縫蛋白質含量 (mg/dl)		
	α_1 -AG	Hp	Tf
本発明製剤	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下
比較製剤	検出限界以下	検出限界以下	8.9

【0028】実施例2

実施例1において、(b)の陰イオン交換体処理工程での0.8M炭酸水素ナトリウムによるpH調整をpH 5.25とすると共に(c)の陽イオン交換体処理工程のpH調整を5.25とする以外は、実施例1と同様にして、アルブミン製剤を調製した。得られたアルブミン製剤について、実施例1と同様な方法でポリマー含量及*

*ごく夾縫蛋白質含量を測定した。その結果、ポリマーのピークは検出されず実質的に含まれていないことが示され、またHp、 α_1 -AG及びTf含量も検出限界以下であり、実質的に含まれていないことが判明した。

【0029】参考例

上記実施例1及び実施例2に示される本発明製剤の調製並びに比較製剤の調製において、陰イオン交換体処理及び陽イオン交換体処理並びに濃縮処理後のアルブミン回収率は表2に示される通りであった。なお、アルブミン回収率は280nmの吸光度により測定した。

【0030】

【表2】

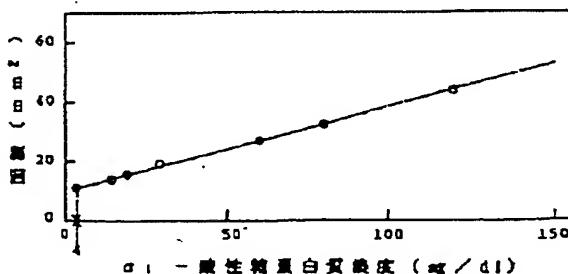
	回収率 (%)		
	実施例1の 本発明製剤	実施例2の 本発明製剤	比較製剤
原料アルブミン溶液 (第V固分ペースト 溶解液、濾過後)	100	100	100
Q.A.Eートヨバール 非吸着・押出し固分	90	94	94
S.P.-トヨバール 非吸着・押出し固分	86	69	-----
ベリコン濃縮物	80	65	88

【0031】上記表2に示されるように、陰イオン交換体処理及び陽イオン交換体処理並びに濃縮処理後のアルブミンの回収率は高く、特に陽イオン交換体処理をpH 5.5で行った場合には回収率が著しく高いことが判明した。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明製剤のゲル通過分析の結果を示す図である。

【図3】



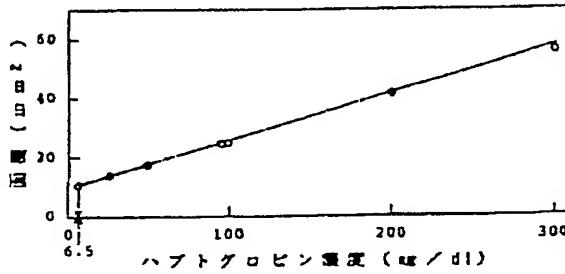
【図2】比較製剤のゲル通過分析の結果を示す図である。

【図3】一元免疫拡散法による α_1 -酸性糖蛋白質測定の標準曲線を示す図である。

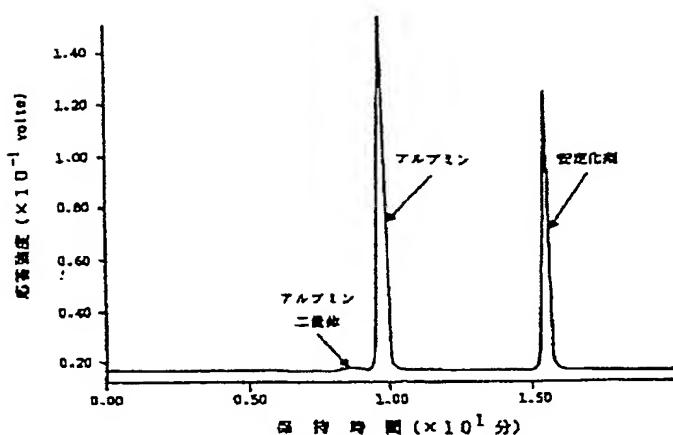
【図4】一元免疫拡散法によるハブトグロビン測定の標準曲線を示す図である。

【図5】一元免疫拡散法によるトランスフェリン測定の標準曲線を示す図である。

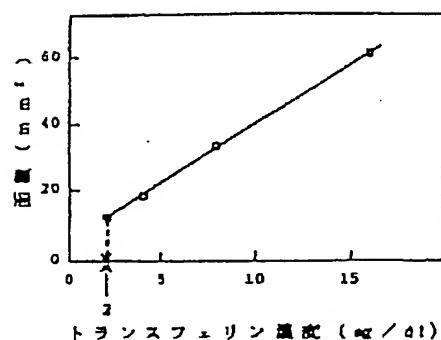
【図4】



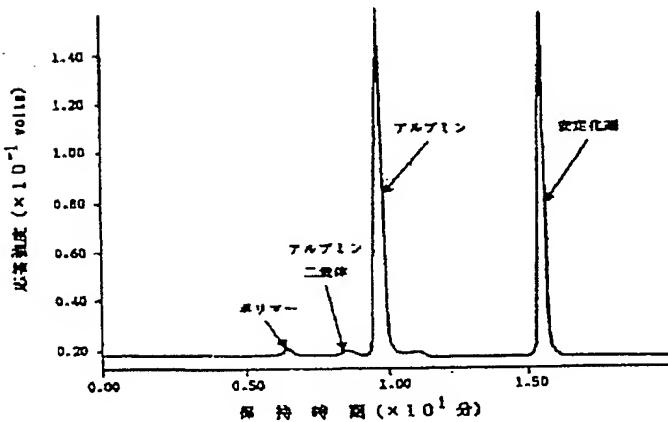
[図1]



[図5]



[図2]



フロントページの続き

(72)発明者 富岡 新二
枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式
会社ミドリ十字中央研究所内

(72)発明者 横山 和正
枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式
会社ミドリ十字中央研究所内